

**PENGARUH EKSTRAK CANDIDA ALBICANS SEBAGAI IMMUNOMODULATOR  
MELALUI IMUNITAS INTERFERON GAMMA (INF- $\gamma$ ) PADA MENCIT**

**MODEL DEMAM TIFOID**

**TUGAS AKHIR**

**Untuk Memenuhi Persyaratan**

**Memperoleh Gelar Sarjana Keperawatan**



**Oleh :**

**IHSANUL FIKRI**

**NIM: 175070201111009**

**PROGRAM STUDI SARJANA KEDOKTERAN**

**FAKULTAS KEDOKTERAN**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**2020**

## DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN .....	Error! Bookmark not defined.
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN .....	Error! Bookmark not defined.
KATA PENGANTAR .....	Error! Bookmark not defined.
ABSTRAK .....	Error! Bookmark not defined.
DAFTAR ISI .....	2
DAFTAR TABEL .....	4
DAFTAR GAMBAR .....	4
BAB I PENDAHULUAN .....	Error! Bookmark not defined.
1.1 Latar Belakang .....	Error! Bookmark not defined.
1.2 Rumusan Masalah .....	Error! Bookmark not defined.
1.3 Tujuan Penelitian .....	Error! Bookmark not defined.
1.3.1 Tujuan Umum .....	Error! Bookmark not defined.
1.3.2 Tujuan Khusus .....	Error! Bookmark not defined.
1.4 Manfaat Penelitian .....	Error! Bookmark not defined.
1.4.1 Manfaat Keilmuan .....	Error! Bookmark not defined.
1.4.2 Manfaat Aplikatif .....	Error! Bookmark not defined.
BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....	Error! Bookmark not defined.
2.1 <i>Candida albicans</i> .....	Error! Bookmark not defined.
2.2 Demam Tifoid .....	Error! Bookmark not defined.
2.3 <i>Salmonella</i> Typhimurium .....	Error! Bookmark not defined.
2.4 Interferon Gamma (INF- $\gamma$ ) .....	Error! Bookmark not defined.
2.5 Mekanisme $\beta$ -glukan dalam Menginduksi Sel-Sel Imun .....	Error! Bookmark not defined.
BAB III KERANGKA KONSEP .....	Error! Bookmark not defined.
3.1 Kerangka Konsep .....	Error! Bookmark not defined.
3.2 Penjelasan Kerangka Konsep .....	Error! Bookmark not defined.
3.3 Alur Kerangka Kerja Penelitian .....	Error! Bookmark not defined.
3.4 Hipotesa .....	Error! Bookmark not defined.
BAB IV METODE PENELITIAN .....	Error! Bookmark not defined.
4.1 Desain Penelitian .....	Error! Bookmark not defined.
4.2 Populasi dan Sampel .....	Error! Bookmark not defined.
4.2.1 Populasi .....	Error! Bookmark not defined.
4.2.2 Jumlah Sampel .....	Error! Bookmark not defined.



4.3	Variabel Penelitian .....	Error! Bookmark not defined.
4.3.1	Variabel Bebas .....	Error! Bookmark not defined.
4.3.2	Variabel Terikat .....	Error! Bookmark not defined.
4.4	Tempat Penelitian .....	Error! Bookmark not defined.
4.5	Definisi Operasional .....	Error! Bookmark not defined.
4.6	Alat dan Bahan .....	Error! Bookmark not defined.
4.6.1	Alat dan Bahan Pembuatan Kultur <i>C. albicans</i> .....	Error! Bookmark not defined.
4.6.2	Alat dan Bahan Pengambilan Darah .....	Error! Bookmark not defined.
4.6.3	Alat dan Bahan Isolasi Dinding Sel <i>C. albicans</i> .....	Error! Bookmark not defined.
4.6.4	Alat dan Bahan Induksi <i>S. Typhimurium</i> ke Mencit .....	Error! Bookmark not defined.
4.6.5	Alat dan Bahan Pemeliharaan Mencit .....	Error! Bookmark not defined.
4.6.6	Alat dan Bahan Pembedahan dan Pengambilan Serum Darah Mencit .....	Error! Bookmark not defined.
4.6.7	Alat dan Bahan Pengukuran menggunakan ELISA .....	Error! Bookmark not defined.
4.7	Prosedur Penelitian .....	Error! Bookmark not defined.
4.7.1	Prosedur Isolasi Dinding Sel <i>C. albicans</i> .....	Error! Bookmark not defined.
4.7.2	Prosedur Uji Keberadaan $\beta$ -glukan pada Dinding Sel <i>Candida albicans</i> .....	Error! Bookmark not defined.
4.7.3	Prosedur Induksi Demam Tifoid .....	Error! Bookmark not defined.
4.7.4	Metode Pemrosesan Darah .....	Error! Bookmark not defined.
4.7.5	Prosedur Pemberian Dosis Ekstrak Dinding Sel <i>C. albicans</i> ke Mencit .....	Error! Bookmark not defined.
4.7.6	Prosedur Pembedahan Mencit .....	Error! Bookmark not defined.
4.7.7	Prosedur Pengukuran Kadar TNF- $\alpha$ dan INF- $\gamma$ menggunakan ELISA .....	Error! Bookmark not defined.
4.8	Pengolahan Data .....	Error! Bookmark not defined.
4.9	Etika Penelitian .....	Error! Bookmark not defined.
BAB V	HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA .....	Error! Bookmark not defined.
5.1	Ekstraksi Dinding Sel <i>Candida albicans</i> .....	Error! Bookmark not defined.
5.2	Pengecekan Infeksi Demam Tifoid pada Mencit .....	Error! Bookmark not defined.
5.3	Hasil Pengukuran Kadar INF- $\gamma$ melalui ELISA .....	Error! Bookmark not defined.
5.4	Hasil Uji Statistik .....	Error! Bookmark not defined.
BAB VI	PEMBAHASAN .....	Error! Bookmark not defined.

6.1 Pengaruh ekstrak *C. albicans* sebagai immunomodulator melalui potensi sitokin INF- $\gamma$  pada demam tifoid..... **Error! Bookmark not defined.**

6.1.1 Penelitian Terdahulu yang Mendukung Hasil Penelitian..... **Error! Bookmark not defined.**

6.2 Dosis efektif ekstrak *C. albicans* immunomodulator melalui potensi sitokin INF- $\gamma$  pada demam tifoid..... **Error! Bookmark not defined.**

6.3 Implikasi Keperawatan..... **Error! Bookmark not defined.**

6.4 Keterbatasan Penelitian..... **Error! Bookmark not defined.**

BAB VII PENUTUP..... **Error! Bookmark not defined.**

7.1 Kesimpulan..... **Error! Bookmark not defined.**

7.2 Saran..... **Error! Bookmark not defined.**

DAFTAR PUSTAKA..... **Error! Bookmark not defined.**

## DAFTAR TABEL

Tabel 1. Indikator mencit yang telah terinfeksi *S. Typhimurium*..... **Error! Bookmark not defined.**

Tabel 2. Hasil Uji One Way ANOVA..... **Error! Bookmark not defined.**

Tabel 3. Hasil Uji Post Hoc Test..... **Error! Bookmark not defined.**

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Alur Kerangka Konsep..... **Error! Bookmark not defined.**

Gambar 2. Alur Kerangka Kerja Penelitian..... **Error! Bookmark not defined.**

Gambar 3. Hasil Ekstraksi *Candida albicans*..... **Error! Bookmark not defined.**

Gambar 4. Diagram rata-rata kadar INF- $\gamma$  (pg/ml)..... **Error! Bookmark not defined.**





## ABSTRAK

Fikri, Ihsanul. 2020. **Pengaruh Ekstrak *Candida albicans* sebagai Immunomodulator melalui Imunitas Interferon Gamma (INF- $\gamma$ ) pada Mencit Model Demam Tifoid.** Tugas Akhir, Program Studi Ilmu Kperawatan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Prof. Dra. Sri Winarsih, M.Sc., Apt (2) Ns. Tony Suharsono, S.Kep., M.Kep

Demam tifoid atau tipes adalah suatu penyakit infeksi sistemik yang disebabkan oleh *Salmonella Typhi*, dengan gambaran demam yang berlangsung lama, adanya bakteremia disertai inflamasi (peradangan) yang dapat merusak usus dan pembengkakan pada hati. Apabila bakteri ini masuk ke dalam tubuh, bakteri tersebut dapat meningkatkan TNF- $\alpha$  yang menyebabkan demam tinggi. Selain itu, kadar INF- $\gamma$  yang berfungsi meningkatkan fungsi makrofag juga akan menurun sehingga bakteri tidak dapat dihancurkan oleh makrofag. Ekstrak dinding sel *Candida albicans* mengandung  $\beta$ -glukan yang memiliki berbagai aktivitas biologis salah satunya peningkat sistem kekebalan tubuh yang dikenal sebagai imunomodulator. Penggunaan imunomodulator pada penyakit infeksi akan mengurangi kemungkinan terjadinya resistensi terhadap antibiotika. Tujuan dari penelitian ini, yakni: mengetahui pengaruh ekstrak *C. albicans* sebagai imunomodulator demam tifoid melalui potensi sitokin INF- $\gamma$  pada mencit Balb/C dan mengetahui dosis efektif ekstrak *C. albicans* sebagai imunomodulator demam tifoid melalui potensi sitokin INF- $\gamma$  pada mencit Balb/C. Metode yang digunakan eksperimen secara in vivo pada mencit sebagai hewan coba. Pembuatan hewan coba model demam tifoid dilakukan dengan menggunakan bakteri *Salmonella Typhimurium*. Perlakuan pada penelitian ini adalah kontrol negatif: mencit yang tidak diinduksi *S. Typhimurium* dan tidak diberi ekstrak, kontrol positif: mencit yang diinduksi *S. Typhimurium* dan tidak diberi ekstrak, kelompok perlakuan 1, 2 dan 3 yakni diinduksi *S. Typhimurium* dan diberi dosis ekstrak *C.albicans* secara berurutan (150  $\mu$ g, 300  $\mu$ g dan 600  $\mu$ g) selama 5 hari. Hasil penelitian didapatkan peningkatan INF- $\gamma$  dengan dosis efektif 300  $\mu$ g. Data penelitian dianalisis dengan metode one-way ANOVA dan didapatkan hasil yang signifikan yakni  $p < 0,5$ . Berdasarkan hasil tersebut maka selanjutnya perlu dilakukan uji klinis untuk diaplikasikan ke manusia, namun sebelum itu perlu dilakukan uji toksisitas untuk mengetahui efek samping dari pemberian  $\beta$ -glukan dari ekstrak jamur *Candida albicans*.

Kata Kunci: *Salmomella Typhi*, *Candida albicans*, Immunomodulator,  $\beta$ -glukan, INF- $\gamma$



## ABSTRACT

Fikri, Ihsanul. 2020. **Effect of *Candida albicans* Extract as Immunomodulator through Gamma Interferon Immunity (IFN- $\gamma$ ) in Typhoid Fever Mice Model.** Final Assignment, Medical Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) Prof. Dra. Sri Winarsih, M.Sc., Apt (2) Ns. Tony Suharsono, S.Kep., M.Kep

Typhoid fever is a systemic infectious disease caused by *Salmonella* Typhi, with a long-lasting fever, bacteremia accompanied by inflammation (inflammation) that can damage the intestines and swelling of the liver. When these bacteria enter the body, these bacteria can increase TNF- $\alpha$  which causes high fever. In addition, IFN- $\gamma$  levels which function to improve the function of macrophages will also decrease so that bacteria cannot be destroyed by macrophages. *Candida albicans* cell wall extract contains  $\beta$ -glukan which has various biological activities, one of which is an immune system enhancer known as immunomodulator. The use of immunomodulators in hurting infections will reduce the possibility of resistance to antibiotics. The objectives of this study were to determine the effect of *C. albicans* extract as an immunomodulator of typhoid fever through the potential of IFN- $\gamma$  cytokines in Balb / C mice and to determine the effective dosage of *C. albicans* extract as an immunomodulator of typhoid through potential cytokine IFN- $\gamma$  in Balb / C mice. The method in this study was an in vivo experiment on mice. The making of experimental models of typhoid fever was carried out using *Salmonella* Typhimurium bacteria. The treatments in this study were negative controls: mice that were not induced by *S. Typhimurium* and not extracted, positive controls: mice induced by *S. Typhimurium* and not extracted, treatment groups 1, 2 and 3 were induced by *S. Typhimurium* and given a dose of extract *Candida albicans* sequentially (150  $\mu$ g, 300  $\mu$ g and 600  $\mu$ g) for 5 days. The research data were analyzed using the one-way ANOVA method and it was said to be significant if  $p < 0,05$ . The results showed increasing of IFN- $\gamma$  with an effective dose of 300  $\mu$ g. Based on these results, it is necessary to carry out clinical trials for application to humans, but before of that, it is necessary to conduct a toxicity test to determine the side effects of  $\beta$ -glukan from the extract of *Candida albicans*.

Keywords: *Salmomella Typhi*, *Candida albicans*, Immunomodulator,  $\beta$ -glukan, IFN- $\gamma$



## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

*Salmonella* Typhi merupakan kuman patogen penyebab demam tifoid, yaitu suatu penyakit infeksi sistemik dengan gambaran demam yang berlangsung lama, adanya bakteremia disertai inflamasi yang dapat merusak usus dan organ hati.

Demam tifoid merupakan penyakit menular yang tersebar di seluruh dunia, dan sampai sekarang masih menjadi masalah kesehatan terbesar di Negara berkembang dan tropis seperti Asia Tenggara, Afrika dan Amerika Latin. Insiden penyakit ini masih sangat tinggi dan diperkirakan sejumlah 21 juta kasus dengan lebih dari 700 kasus berakhir dengan kematian dan 90% kematian tersebut terjadi di Asia (WHO, 2017). Di Indonesia, insiden demam tifoid diperkirakan sekitar 300-810 kasus per 100.000 penduduk per tahun, artinya jumlah kasus berkisar antara 600.000-1.500.000 per tahun.

Masalah resistensi antibiotik meningkat secara signifikan dalam waktu 30 tahun terakhir. Resistensi antibiotik dapat terjadi akibat penyalahgunaan antibiotik, seperti tidak tepat indikasi, durasi dan dosis (Frieden, 2013). Salah satu contoh bakteri yang telah mengalami resistensi antibiotik adalah bakteri penyebab demam tifoid yakni *Salmonella* Typhi. Bahkan dikatakan saat ini, bahwa pemberian antibiotik adalah penginduksi resistensi bakteri. Sehingga sangat diperlukan untuk mencari terapi lain disamping pemberian antibiotik seperti terapi immunomodulator yang bekerja dengan menginduksi sistem imun tubuh untuk menghancurkan bakteri yang dapat meminimalisir resistensi obat-obatan.



Ektrak dinding sel *Candida albicans* mengandung  $\beta$ -glukan yang memiliki berbagai aktivitas biologis salah satunya peningkat sistem imun atau peningkat sistem kekebalan tubuh yang dikenal sebagai immunomodulator. *Candida albicans* merupakan jamur yang mudah untuk dikultur dan  $\beta$ -glukannya merupakan immunomodulator poten. Disebutkan oleh *Food and Drug Administration* / FDA milik Amerika Serikat, bahwa  $\beta$ -glukan termasuk kategori *Generally recognized as safe* serta tidak memiliki toksisitas atau efek samping. Zat-zat yang terkandung dapat merangsang sistem kekebalan tubuh, modulasi imunitas humoral dan selular, dengan demikian memiliki efek menguntungkan dalam memerangi infeksi bakteri, virus, jamur dan parasit. Ketika *Salmonella Typhi* masuk ke dalam sel inang maka bakteri tersebut dapat bertahan hidup di dalam makrofag dan menurunkan fungsi makrofag untuk memfagosit bakteri tersebut. Dalam hal ini, dibutuhkan bantuan sitokin yang dapat mengaktifkan fungsi makrofag yakni INF- $\gamma$  agar makrofag dapat membunuh bakteri tersebut. Oleh karena itu, penjelasan di atas mendasari peneliti untuk membuat sebuah penelitian dalam menguji efek ekstrak *Candida albicans* sebagai immunomodulator pada demam tifoid melalui potensi sitokin INF- $\gamma$ .

## 1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana pengaruh ekstrak *C. albicans* pada demam tifoid melalui potensi sitokin INF- $\gamma$  pada mencit Balb/C?
2. Berapakah dosis efektif ekstrak *Candida albicans* pada demam tifoid melalui potensi sitokin INF- $\gamma$  pada mencit Balb/C?

### 1.3 Tujuan Penelitian

#### 1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh ekstrak *Candida albicans* melalui potensi sitokin INF- $\gamma$  pada mencit Balb/C yang diinduksi demam tifoid.

#### 1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengidentifikasi pengaruh ekstrak *C. albicans* sebagai immunomodulator demam tifoid melalui potensi sitokin INF- $\gamma$  pada mencit Balb/C.
2. Mengidentifikasi dosis efektif ekstrak *C. albicans* sebagai immunomodulator demam tifoid melalui potensi sitokin INF- $\gamma$  pada mencit Balb/C.

### 1.4 Manfaat Penelitian

#### 1.4.1 Manfaat Keilmuan

1. Mengeksplorasi penerapan ekstrak *Candida albicans* sebagai immunomodulator sebagai alternatif terapi penyakit demam tifoid dan meminimalisir resistensi antibiotik.
2. Menjadi sarana untuk menambah khasanah pengetahuan di bidang kesehatan dalam hal penelitian guna menangani penyakit demam tifoid.

#### 1.4.2 Manfaat Aplikatif

Menjadi pertimbangan perusahaan industri obat guna menciptakan alternatif pengobatan akibat infeksi *S. Typhi*. Selain itu pemanfaatan ekstrak *Candida albicans* juga diharapkan mampu mendukung program pemerintah dan dunia untuk meningkatkan kualitas kesehatan yang tercantum dalam SDG's serta membantu WHO dalam menanggulangi masalah resistensi obat-obatan.



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 1.1 *Candida albicans*

Jamur *Candida albicans* merupakan organisme komensal dan berperan dalam keseimbangan mikroorganisme dalam tubuh sebagai flora normal yang berada di rongga mulut, saluran pencernaan dan vagina. *Candida albicans* secara makroskopis berbentuk bulat, lonjong atau bulat lonjong. *Candida albicans* sama dengan bakteri yang memiliki dinding sel berfungsi sebagai pelindung dan target dari beberapa antifungi.

Struktur dinding sel *Candida albicans* sangat kompak dan tebalnya 100 sampai 400 nm serta terdiri dari lima lapisan yang berbeda. Komposisi primer dinding sel *Candida albicans* terdiri dari glukukan, manan, dan khitin. Manan dan protein berjumlah sekitar 15, 2-30%,  $\beta$ -1, 3-D-glukan dan  $\beta$ -1, 6-glukan (47-60%), kitin (0, 6-9%), protein (6-25%), dan lipid (1-7%) dari berat kering dinding sel (Pelczar dan Chan, 2005; Tjampakasari, 2006).

#### 1.2 Demam Tifoid

Demam tifoid atau yang umumnya dikenal sebagai tifus abdominalis, disebabkan oleh bakteri gram negatif dari genus *Salmonella*, spesies *Salmonella enterica* subspesies *enterica* serovar Typhi (*Salmonella* Typhi) (Kanungo, 2008). Spesies *Salmonella* patogen dimakan sel fagosit, menembus mukosa ke makrofag di lamina propria, difagosit makrofag. Saat jumlahnya sangat banyak, makrofag mengalami apoptosis, bakteri keluar ke pembuluh darah dan menginvasi seluruh tubuh. Demam dimulai 7-14 hari setelah infeksi bakteri dengan siklus suhu tubuh

yang meningkat secara progresif menjelang malam hari dan turun pada pagi hari. Pada minggu pertama, muncul manifestasi gastrointestinal seperti diare hingga sembelit, keluhan batuk kering, sakit kepala bagian depan, delirium, dan lemah. Pada minggu kedua, perut menjadi buncit, dapat ditemui pembesaran limpa. Bila tidak terobati, dapat menyebabkan perforasi usus yang menyebabkan sepsis (Ochiai, 2008).

### 1.3 *Salmonella* Typhimurium

*S. Typhimurium* adalah bakteri bentuk batang, dari genus *Salmonella*, spesies *Salmonella enterica* dan subspecies *enterica* serovar Typhimurium. Pada pengecatan gram berwarna merah muda (gram negatif), berukuran  $2-4 \mu\text{m} \times 0,6 \mu\text{m}$ , mempunyai flagel dan tidak berspora. Bakteri ini digunakan sebagai model demam tifoid pada mencit (Brenner, 2013).

### 1.4 Interferon Gamma (INF- $\gamma$ )

INF- $\gamma$  merupakan jenis protein yang tergabung ke dalam keluarga besar sitokin yakni pengatur imunitas tubuh. INF- $\gamma$  berperan dalam aktivasi makrofag dan menjadi *cell mediated immunity* terhadap mikroba intraseluler. INF- $\gamma$  dihasilkan oleh endogen sel limfosit T yang mengekspresikan sel T CD4<sup>+</sup> dan sel T CD8<sup>+</sup> serta sel *Natural Killer* (NK) yang telah teraktivasi akibat respon terhadap stimulus antigen yang masuk ke dalam tubuh. Sel T CD4<sup>+</sup> berdiferensiasi menjadi sel Th 1 yang kemudian mensintesis INF- $\gamma$  untuk mengaktivasi makrofag yang dapat meningkatkan respon imun terhadap bakteri. Sel T helper-1 (Th 1) sangat berperan dalam sistem pertahanan tubuh terutama dalam menghadapi infeksi bakteri intraseluler (Teguh, 2010).





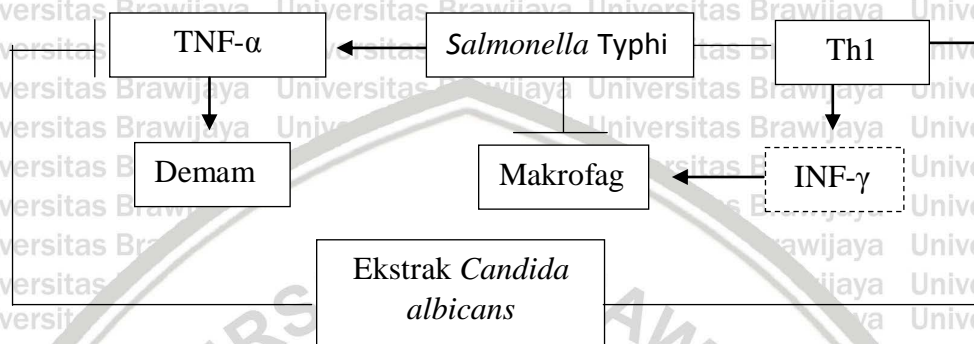
Sedangkan sel T CD8<sup>+</sup> berespon terhadap bakteri intraseluler yang lolos dari mekanisme fagositosis oleh makrofag, sel T CD8<sup>+</sup> juga akan melepaskan INF- $\gamma$  yang akan mengenali sel host yang terinfeksi bakteri. INF- $\gamma$  sebagai *cell mediated immunity* bekerja dengan 2 tipe reaksi yaitu pertama, sel CD4<sup>+</sup> merekrut sel fagosit dan INF- $\gamma$  akan membunuh mikroba yang telah difagositosis. Kedua, *cytotoxic T lymphocytes* CD8<sup>+</sup> membunuh sel host yang telah terinfeksi bakteri dengan mekanisme apoptosis (Abbas *et al*, 2007).

### 1.5 Mekanisme $\beta$ -glukan dalam Menginduksi Sel-Sel Imun

$\beta$ -glukan merupakan immunomodulator yang poten untuk sistem imun inat dan adaptif.  $\beta$ -glukan tidak dimiliki oleh sel manusia sehingga dapat memicu respon imun yang efektif seperti fagositosis dan produksi faktor proinflamasi yang berakhir pada eliminasi agen infeksius (Schorey and Lawrence, 2008). Beberapa reseptor yang berperan dalam menginduksi sel imun adalah *scavenger receptor* yang akan mengaktifkan jalur sinyal PI3K (phosphatidylinositol-3 kinase), Aktivase kinase, dan MAPK (p38 mitogen-activated protein kinase).  $\beta$ -glukan dari *C. albicans* dapat berikatan pada reseptor LacCer dan mengaktifkan jalur PI-3K dan mengatur migrasi neutrofil (Sato *et al*, 2006).

### BAB III KERANGKA KONSEP

#### 3.1 Kerangka Konsep



Keterangan



Gambar 1. Alur Kerangka Konsep

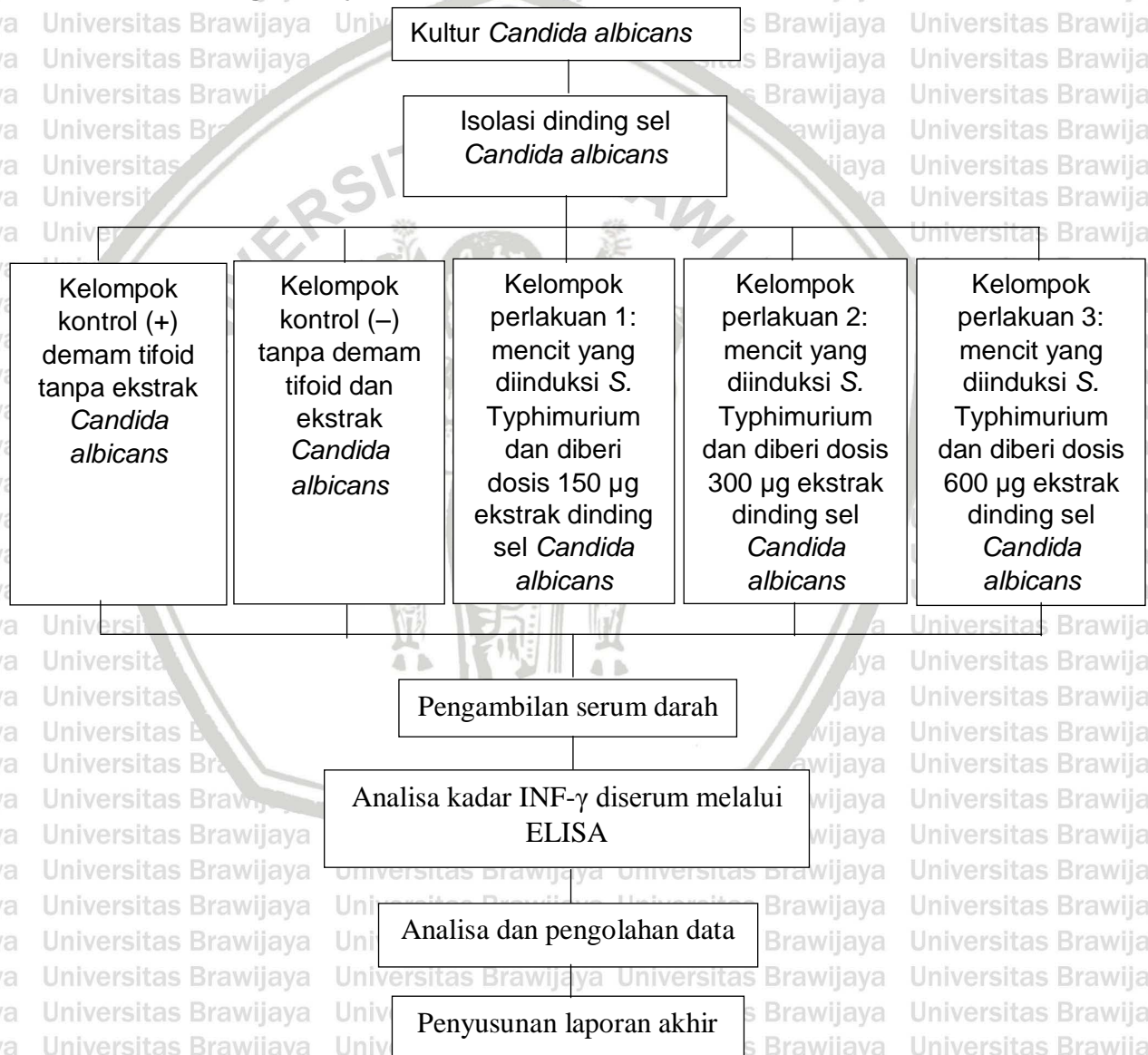
#### 3.2 Penjelasan Kerangka Konsep

Ketika bakteri *Salmonella* masuk ke dalam tubuh, maka tubuh akan merespon dengan mengeluarkan protein imun yaitu TNF- $\alpha$  untuk membunuh bakteri dengan meningkatkan suhu tubuh, namun apabila demam dibiarkan secara terus menerus maka dapat menyebabkan kerusakan sel-sel tubuh. Kemudian tubuh juga akan mengeluarkan sebuah protein imun lain yaitu makrofag yang berfungsi untuk menghancurkan bakteri dengan mekanisme fagositosis, namun bakteri salmonella memiliki mekanisme hidup yang unik ketika masuk ke dalam tubuh, bakteri *Salmonella* dapat bersembunyi di dalam makrofag dan membuat makrofag inaktif atau tidak berfungsi untuk menghancurkan bakteri. Sehingga dari itu untuk dapat mengaktifkan makrofag kembali, tubuh membutuhkan protein imun yaitu INF- $\gamma$  yang



berfungsi untuk mengaktifkan makrofag namun gagal karena jumlah yang tidak tercukupi. Lalu peran  $\beta$ -glukan dari ekstrak *Candida albicans* akan meningkatkan jumlah INF- $\gamma$  sehingga akan mampu mengaktifkan makrofag dan makrofag akan aktif kembali dengan jumlah yang adekuat untuk membunuh bakteri *Salmonella*.

### 3.3 Alur Kerangka Kerja Penelitian



**Gambar 2. Alur Kerangka Kerja Penelitian**

### 3.4 Hipotesa

$\beta$ -glukan dari ekstrak *Candida albicans* dapat meningkatkan kadar INF- $\gamma$  pada mencit yang diinduksi bakteri penyebab demam tifoid.





## BAB IV METODE PENELITIAN

### 4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini adalah eksperimen murni (*true experimental design*) secara *in vivo* dengan randomized *post-test only controlled group design* pada mencit sebagai hewan coba. Perlakuan pada penelitian ini: Kontrol negatif: mencit yang tidak diinduksi *S. Typhimurium* dan tidak diberi perlakuan apapun kecuali perawatan standar. Kontrol positif: mencit yang diinduksi *S. Typhimurium* dan tidak diberi perlakuan apapun kecuali perawatan standar. Kelompok perlakuan 1: mencit yang diinduksi *S. Typhimurium* dan diberi dosis 150 µg ekstrak dinding sel *Candida albicans* selama 5 hari. Kelompok perlakuan 2: diinduksi *S. Typhimurium* dan diberi dosis 300 µg ekstrak dinding sel *Candida albicans*. Kelompok perlakuan 3: diinduksi *S. Typhimurium* dan diberi dosis 600 µg ekstrak dinding sel *Candida albicans*.

### 4.2 Populasi dan Sampel

#### 4.2.1 Populasi

Populasi penelitian ini adalah mencit jantan strain Balb/C yang diperoleh dari Pusat Veterinaria Farma (PUSVETMA) Surabaya berusia 6 minggu, dengan berat 20-30 gram. Mencit Balb/C merupakan mencit yang sering digunakan untuk memelajari patogenesis *S. Typhi* (pada mencit *S. Typhimurium*) (Özkaya *et al*, 2012).

#### 4.2.2 Jumlah Sampel

Teknik yang digunakan untuk pemilihan sampel dari populasi adalah *simple random sampling*, karena teknik ini dapat meminimalisir bias. Jumlah minimal



sampel yang dibutuhkan dihitung menggunakan rumus dari Loekito yaitu  $p(n-1) \geq 15$ , dengan  $p$  merupakan jumlah perlakuan dan  $n$  adalah jumlah sampel per kelompok. Pada penelitian ini, jumlah perlakuan adalah 5, sehingga didapatkan nilai  $n$  sebagai berikut:

$$p(n-1) \geq 15; \text{ (Lukito, 1998).}$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Jumlah sampel minimal yang dibutuhkan adalah 4 mencit per kelompok perlakuan. Pada penelitian ini, jumlah total sampel yang dibutuhkan adalah sebanyak minimal 20 mencit

#### 4.3 Variabel Penelitian

##### 4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak dinding sel *Candida albicans*.

##### 4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dari penelitian ini adalah kadar INF- $\gamma$  pada serum darah mencit.

#### 4.4 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biomedik, Faal, Parasitologi, dan Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang,



#### 4.5 Definisi Operasional

1. Mencit Balb/C yang dipergunakan memiliki jenis kelamin jantan dan berasal dari PUSVETMA Surabaya.
2. *S. Typhimurium* yang dipergunakan didapatkan dari kultur yang didapatkan dari isolat lokal di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Brawijaya.
3. Mencit model demam tifoid adalah mencit yang telah diinduksi dengan bakteri *S. Typhimurium* per oral dengan jumlah  $10^8$  CFU sebanyak 300 $\mu$ L 2 kali selang 2 hari.
4. *C. albicans* yang dipergunakan didapatkan dari kultur yang ditanam pada Sabouraud Dextrose Agar (SDA) selama 24 jam di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
5. Ekstrak dinding sel *C.albicans* didapatkan dari proses isolasi dinding sel dan keberadaan  $\beta$ -glukan diuji dengan *fourier transform infrared* (FTIR)
6. Kadar sitokin TNF- $\alpha$  dan INF- $\gamma$  pada mencit diukur pada serum darah yang diambil secara intrakardial pada mencit dan diukur menggunakan ELISA secara indirek

#### 4.6 Alat dan Bahan

##### 4.6.1 Alat dan Bahan Pembuatan Kultur *C. albicans*

Untuk membuat kultur *C. albicans* diperlukan ose, cawan petri, bunsen burner, Sabouraud Dextrose Agar, koloni *C. albicans*, dan inkubator.

##### 4.6.2 Alat dan Bahan Pengambilan Darah

Alat : Spuit, dan *vacuotainer*. Bahan : Kloroform, dan EDTA.

##### 4.6.3 Alat dan Bahan Isolasi Dinding Sel *C. albicans*

Alat : Sentrifus, *ependorf* dan *vortex*. Bahan : *Phosphate-buffered saline* (PBS), SDS buffer, fenilmetilsulfonil florida (PMSF), sodium asetat, *glass bead*, dan akuades.

#### 4.6.4 Alat dan Bahan Induksi *S. Typhimurium* ke Mencit

Alat yang diperlukan adalah kateter 10 FG, ose, slide, bunsen burner, mikroskop, spuit 5 cc dan jarum suntik, *vaccuotainer*, dan EDTA. Sementara bahan yang diperlukan adalah *S. Typhimurium*  $1 \times 10^8$  CFU/mL, dan Bismuth Sulfite Agar dalam cawan petri.

#### 4.6.5 Alat dan Bahan Pemeliharaan Mencit

Pada pemeliharaan mencit diperlukan kandang pemeliharaan mencit, tutup kandang dari anyaman kawat, sekam, botol minum, tempat makan, dan pakan standar mencit yaitu *cornfeed*.

#### 4.6.6 Alat dan Bahan Pembedahan dan Pengambilan Serum Darah Mencit

Alat dan bahan yang digunakan adalah gunting, pinset, jarum pentul, meja bedah, kapas, toples, kloroform, alkohol, spuit, *vaccuotainer*, *icebox*, vial, formalin, dan alumunium foil.

#### 4.6.7 Alat dan Bahan Pengukuran menggunakan ELISA

Alat yang digunakan yaitu ELISA reader 450 nm, *well plate*, sentrifus, pipet, blue tip, dan mikrotube. Bahan yang digunakan adalah serum darah hewan coba, PBS, PBS-Tween-20, bovine serum albumin, dan antibodi INF- $\gamma$ .

### 4.7 Prosedur Penelitian

#### 4.7.1 Prosedur Isolasi Dinding Sel *C. albicans*



Sebanyak 5 mg sel kering dicuci dengan PBS 2x kemudian diendapkan kembali di PBS. Dihancurkan dengan *glass bead* sebanyak 5x masing-masing selama 1 menit. Disentrifus dan dicuci dengan buffer sebanyak 10x. Ekstraksi dinding sel dengan pendidihan 0,5 mL buffer SDS (50 mM Tris HCl; pH 8, 0,1 MEDTA; 2% SDS; 10 mM dithiothreitol) selama 10 menit. Dinding sel dicuci sebanyak 10x dengan 0,5 mL 0,1 M sodium asetat dingin (0°C pH 5,5) dengan 1 mM PMSF. Terakhir, dicuci sebanyak 5x dengan 0,4 mL air dingin (4°C).

#### 4.7.2 Prosedur Uji Keberadaan $\beta$ -glukan pada Dinding Sel *Candida albicans*

Kandungan  $\beta$ -glukan pada ekstrak dinding sel *Candida albicans* dianalisis dengan cara SDS-PAGE menggunakan pewarna *periodic acid-Schiff* (PAS). Keberadaan  $\beta$ -glukan pada glikoprotein dinding sel *Candida albicans* akan tampak berwarna oleh pewarna *periodic acid-Schiff* (PAS).

#### 4.7.3 Prosedur Induksi Demam Tifoid

Semua kelompok perlakuan kecuali kelompok kontrol negatif diinfeksi *S. Typhimurium* dengan cara mensonde 0,1 mL suspensi yang mengandung  $5.0 \text{ Log CFU ml}^{-1}$ .

#### 4.7.4 Metode Pemrosesan Darah

Darah diambil melalui jantung (*intracardiac*) sebanyak 1 mL. Darah dibiarkan dalam posisi miring pada suhu kamar selama 2 jam. Ditambahkan Ficoll, selanjutnya disentrifugasi kecepatan 3000 rpm, 10 menit pada suhu 4°C sehingga terbentuk tiga fase, bagian atas berwarna kuning (serum), *buffy coat*, ficoll dan bagian bawah berwarna merah (sel darah). Serum dipisahkan, dimurnikan dengan amonium sulfat, dan akan digunakan untuk pemeriksaan INF- $\gamma$  dengan ELISA.

#### 4.7.5 Prosedur Pemberian Dosis Ekstrak Dinding Sel *C. albicans* ke Mencit

Ekstrak dinding sel *C. albicans* yang mengandung  $\beta$ -glukan diberikan ke mencit dengan dosis 150, 300 dan 600  $\mu\text{g}/0,1 \text{ mL}$  per oral menggunakan kateter (Pullinger *et al.*, 2010).

#### 4.7.6 Prosedur Pembedahan Mencit

Mencit yang telah dibius dengan kloroform kemudian diletakkan pada meja bedah, dengan lengan dan kakinya direntangkan, kemudian ditahan dengan jarum pentul. Perut mencit lalu dibuka dengan gunting dan pinset dengan insisi dari anus sampai dagu (Parkinson *et al.*, 2011).

#### 4.7.7 Prosedur Pengukuran Kadar TNF- $\alpha$ dan INF- $\gamma$ menggunakan ELISA

Serum darah mencit diambil secara intrakardiak. ELISA *plate* di-coating semalaman pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$  dengan pada sampel serum sejumlah 50  $\mu\text{l}$  dengan kadar 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  di dalam larutan PBS. Dilakukan pencucian dengan PBS yang mengandung Tween-20 0,05%, lalu *well plate* diblok selama 2 jam dengan bovine serum albumin 5% dan PBS yang mengandung Tween-20 0,05%. Dilakukan dilusi serum dengan dengan 5% bovine serum albumin/0,05% Tween-20 dan ditetaskan ke *well plate* ELISA. Setelah inkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ , plate dicuci 5 kali dan diinkubasi dengan antibodi sekunder dengan dilusi 1:500. Setelah dicuci, munculnya antibodi INF- $\gamma$  diukur dengan melihat perubahan warna pada substrat ABTS. Reaksi dihentikan dengan HCl 0,33 M dan kemudian dianalisa dengan ELISA reader dengan panjang gelombang 450 nm (Gupta, 2008).



#### 4.8 Pengolahan Data

Data yang didapat berupa kadar TNF- $\alpha$  dan INF- $\gamma$  dalam serum darah mencit yang akan diinterpretasi dengan uji hipotesis *One Way ANOVA* pada taraf kepercayaan 95%.

#### 4.9 Etika Penelitian

Penelitian ini telah memenuhi kelayakan etik dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dengan Nomor 128/EC/KEPK-S1-PKM/04/2019.

Penelitian ini menggunakan atau menerapkan prinsip etik penelitian kesehatan yang tercantum dalam *World Medical Association* sebagai berikut.

1. *Respect* artinya hewan coba harus dihormati layaknya sebagai makhluk hidup sehingga peneliti harus bertanggungjawab terhadap hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini.
2. *Beneficiary* artinya kebermanfaat yang akan diperoleh peneliti lebih besar dibandingkan dengan resiko yang ada.
3. *Justice* artinya peneliti bersikap adil dalam memanfaatkan hewan coba baik dalam perawatan maupun perlakuan.

Selain itu juga peneliti mempertimbangkan prinsip 3R dalam protokol penelitian sebagai berikut.

1. *Replacement* artinya keperluan memanfaatkan hewan coba sudah diperhitungkan secara seksama, baik dari pengalaman terdahulu maupun literatur untuk menjawab pertanyaan penelitian dan tidak dapat digantikan oleh makhluk hidup lain seperti sel atau biakan jaringan.

2. *Reduction* diartikan sebagai pemanfaatan hewan coba dalam penelitian sesedikit mungkin, tetapi tetap mendapatkan hasil yang optimal. Jumlah minimum biasa dihitung menggunakan rumus Loekito yaitu  $p(n-1) \geq 15$ , dengan  $p$  merupakan jumlah perlakuan dan  $n$  adalah jumlah sampel per kelompok.

3. *Refinement* artinya memperlakukan hewan coba secara manusiawi (*humane*), memelihara hewan dengan baik, tidak menyakiti hewan, serta meminimalisasi perlakuan yang menyakitkan sehingga menjamin kesejahteraan hewan coba sampai akhir penelitian.



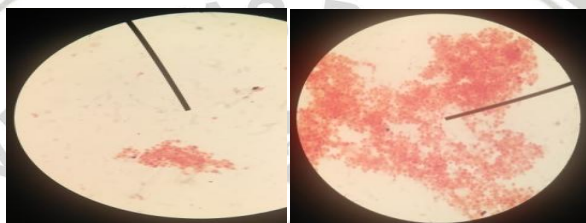


## BAB V

## HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Ekstraksi Dinding Sel *Candida albicans*

Untuk mengetahui dinding sel *Candida albicans* sudah lepas atau tidak maka dilakukan pewarnaan gram. Jika pada sel masih terdapat warna biru, maka dinding sel belum lepas namun jika berwarna merah maka ekstraksi berhasil.



Gambar 1. Hasil Ekstraksi *Candida albicans*

Dari hasil pengamatan pada Gambar 3, dapat dilihat bahwa sel menunjukkan warna merah secara menyeluruh yang menandakan dinding sel telah lepas secara sempurna sehingga ekstrak dapat digunakan.

## 5.2 Pengecekan Infeksi Demam Tifoid pada Mencit

Data hasil Induksi bakteri *S. Typhimurium*, memperlihatkan perubahan kondisi mencit menjadi *lethargy* (lemah dan lesu) serta perubahan bulu menjadi kusut setelah diberikan *S. Typhimurium* per oral sebanyak 300 $\mu$ L yang diberikan 2 kali selang 2 hari.

Munculnya kondisi *lethargy* (lemah dan lesu) dan perubahan bulu menjadi kusut terjadi pada hari ke-3 sampai hari ke-5 pada Kontrol positif (+), Perlakuan 1 (P1), Perlakuan 2 (P2) dan Perlakuan 3 (P3) yang diperlihatkan pada Tabel 1.

**Tabel 1. Indikator mencit telah terinfeksi *S. Typhimurium***

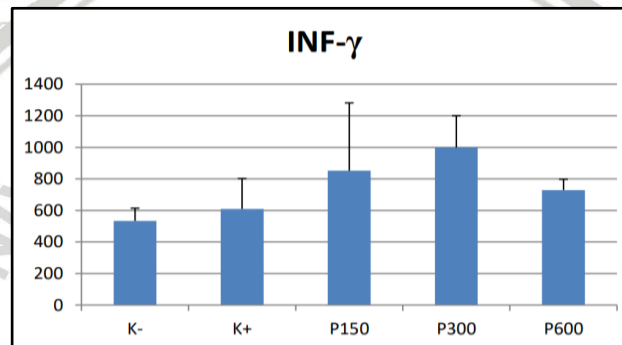
Kelompok Kontrol	<i>Lethargy</i>	Kondisi Bulu Berubah/Kusut
<b>Kontrol (+)</b>		
K1 (+)	Hari ke-3	Hari ke-4
K2 (+)	Hari ke-3	Hari ke-5
K3 (+)	Hari ke-4	Hari ke-5
K4 (+)	Hari ke-4	Hari ke-5
<b>Kontrol (-)</b>		
K1 (-)	-	-
K2 (-)	-	-
K3 (-)	-	-
K4 (-)	-	-
<b>Dosis 150 µg (P1)</b>		
P1.1	Hari ke-4	Hari ke-5
P1.2	Hari ke-5	Hari ke-5
P1.3	Hari ke-4	Hari ke-5
P1.4	Hari ke-4	Hari ke-5
<b>Dosis 300 µg (P2)</b>		
P2.1	Hari ke-4	Hari ke-5
P2.2	Hari ke-3	Hari ke-5
P2.3	Hari ke-4	Hari ke-4
P2.4	Hari ke-4	Hari ke-5
<b>Dosis 600 µg (P3)</b>		
P3.1	Hari ke-4	Hari ke-5
P3.2	Hari ke-4	Hari ke-5
P3.3	Hari ke-3	Hari ke-5
P3.4	Hari ke-3	Hari ke-5

Berdasarkan pengamatan yang dilakukan, dapat disimpulkan bahwa pada hari ke-5 semua mencit yang mendapatkan induksi bakteri *S. Typhimurium* telah terinfeksi demam tifoid yang ditandai munculnya *lethargy* (kondisi lemah dan lesu) serta perubahan fisik pada bulu menjadi kusut. Oleh karena itu, induksi ekstrak *Candida albicans* dapat diberikan pada hari ke-6 pasca mencit telah terinfeksi demam tifoid.



### 5.3 Hasil Pengukuran Kadar INF- $\gamma$ melalui ELISA

Pengukuran kadar INF- $\gamma$  diukur melalui ELISA setelah mencit diinduksi ekstrak *Candida albicans*. Dari hasil pengukuran kadar INF- $\gamma$  pada Gambar 4, didapatkan rata-rata kadar INF- $\gamma$  secara berurutan yaitu kontrol negatif (-) sebesar 534,00, Kontrol positif (+) sebesar 609,83, P1 (dosis 150  $\mu$ g) sebesar 851,50, P2 (dosis 300  $\mu$ g) sebesar 999,00 dan P3 (dosis 600  $\mu$ g) sebesar 72,00.



Gambar 2. Diagram rata-rata kadar INF- $\gamma$  (pg/ml)

Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa hasil pengukuran kadar INF- $\gamma$  tertinggi ditunjukkan pada kelompok perlakuan 2 (P2) dengan pemberian dosis ekstrak *Candida albicans* sebanyak 300  $\mu$ g.

### 5.4 Hasil Uji Statistik

#### Uji Normalitas

Uji normalitas pada penelitian ini menggunakan *Shapiro-Wilk* dan didapatkan nilai  $p$ -value = 0,242 yang artinya  $p$ -value > 0,05 sehingga disimpulkan data berdistribusi normal.

#### Uji Homogenitas

Uji homogenitas pada penelitian ini menggunakan *Levene test* dan didapatkan nilai  $p\text{-value} = 0,089$  yang artinya  $p\text{-value} > 0,05$  sehingga disimpulkan data bersifat homogen.

### Uji One Way ANOVA

Pengujian hipotesis menggunakan One Way Anova untuk menilai apakah ada perbedaan rerata antar kelompok yang diteliti.

**Tabel 2. Hasil Uji One Way ANOVA**

	Sum of Squares	Df	Mean	Sig.
Between Groups	4911.700	4	1227.925	.000
Within Groups	1003.250	15	66.883	
Total	5914.950	19		

Berdasarkan tabel 2, nilai sig. 0,000 menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan pada seluruh kelompok penelitian. Berdasarkan hasil tersebut maka hipotesis penelitian terbukti bahwa  $\beta$ -glukan dari ekstrak *Candida albicans* memiliki pengaruh terhadap peningkatan kadar INF- $\gamma$  pada mencit yang diinduksi bakteri penyebab demam tifoid.

Namun, hasil dari ANOVA tersebut bersifat menyeluruh pada semua kelompok perlakuan sehingga dari itu, untuk mengetahui perbedaan signifikan atau tidak antar kelompok penelitian maka dilakukan dengan Uji *Post Hoc Test*.

**Tabel 3. Hasil Uji Post Hoc Test**

Kelompok	Kelompok	Mean	$\alpha$	Minimum	Maximum	Sig.
K (-)	K (+)	-45.25000*	< 0,05	-57.5759	-32.9241	.000
	P1	-26.75000*	< 0,05	-39.0759	-14.4241	.000
	P2	-19.00000*	< 0,05	-31.3259	-6.6741	.005
	P3	-37.50000*	< 0,05	-49.8259	-25.1741	.000
K (+)	K (-)	45.25000*	< 0,05	32.9241	57.5759	.000
	P1	18.50000*	< 0,05	6.1741	30.8259	.006
	P2	26.25000*	< 0,05	13.9241	38.5759	.000
	P3	7.75000	< 0,05	-4.5759	20.0759	.200
P1	K (-)	26.75000*	< 0,05	14.4241	39.0759	.000
	K (+)	-18.50000*	< 0,05	-30.8259	-6.1741	.006
	P2	7.75000	< 0,05	-4.5759	20.0759	.200



P2	P3	-10.75000	< 0,05	-23.0759	1.5759	.083
	K (-)	19.00000*	< 0,05	6.6741	31.3259	.005
	K (+)	-26.25000*	< 0,05	-38.5759	-13.9241	.000
	P1	-7.75000	< 0,05	-20.0759	4.5759	.200
	P3	-18.50000*	< 0,05	-30.8259	-6.1741	.006
P3	K (-)	37.50000*	< 0,05	25.1741	49.8259	.000
	K (+)	-7.75000	< 0,05	-20.0759	4.5759	.200
	P1	10.75000	< 0,05	-1.5759	23.0759	.083
	P2	18.50000*	< 0,05	6.1741	30.8259	.006

Keterangan tanda bintang ( \* ) menunjukkan terdapat perbedaan rerata antar kelompok

Berdasarkan hasil uji *Post Hoc Test* pada Tabel 3, diketahui nilai sig. < 0,05 atau dengan melihat Mean jika terdapat tanda bintang ( \* ) hal itu menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan pada rerata antar kelompok perlakuan.

